

基于网络药理学和分子对接技术的热毒宁注射液抗 SARS、MERS 和 COVID-19 的潜在共性作用机制与活性成分研究

王高举, 焦红军

郑州大学第二附属医院, 河南 郑州 450014

摘要: **目的** 采用网络药理学与分子对接技术探讨热毒宁注射液抗严重急性呼吸综合征 (SARS)、中东呼吸综合征 (MERS) 和新型冠状病毒肺炎 (COVID-19) 的潜在共性作用机制与活性成分。 **方法** 利用中药系统药理学数据库和分析平台 (TCMSP) 数据库检索热毒宁注射液中青蒿、金银花、梔子的主要化学成分及其作用靶点。运用 UniProt 数据库查询相关靶点对应的基因, 通过 Cytoscape 3.8.2 构建中药材-化合物-靶点 (基因) 网络; 在 GeneCards 数据库中搜集 “COVID-19” “SARS” 和 “MERS” 相关靶点, 通过 Venny 2.1.0 数据库映射筛选出 3 种冠状病毒感染疾病的共有靶点; 将 SARS、MERS 和 COVID-19 的共有靶点与热毒宁注射液化合物靶点进行交集筛选出共同靶点作为研究靶点; 将共同靶点导入 STRING 数据库获取数据后, 使用 Cytoscape 3.8.2 软件构建蛋白质-蛋白质相互作用 (PPI) 的网络图; 利用 R 语言进行基因本体论 (GO) 生物学功能富集分析及京都基因和基因组百科全书 (KEGG) 信号通路富集分析, 绘制柱状图及气泡图进行可视化分析, 并构建成分-靶点-通路网络图; 选取成分-靶点-通路网络中关键化合物与重要靶点蛋白及新型冠状病毒 (SARS-CoV-2) 3CL 水解酶、血管紧张素转化酶 II (ACE2) 进行分子对接。 **结果** 热毒宁注射液筛选得到 31 个活性化合物中, 207 个相应作用靶点; SARS 相关靶点 2 453 个, MERS 相关靶点 805 个, COVID-19 相关靶点 2 571 个, 3 种疾病共有靶点 786 个, 与热毒宁注射液的共同靶点 11 个, 分别为 HSPA5、CRP、MAPK1、HMOX1、TGFB1、HSP90AA1、TP53、DPP4、CXCL10、PLAT、PRKACA。GO 功能富集分析得到生物进程 (BP) 995 个, 分子功能 (MF) 71 种, 细胞组分 (CC) 31 种。KEGG 通路富集分析筛选得到 99 条信号通路 ($P < 0.05$), 主要涉及前列腺癌、流体剪切应力和动脉粥样硬化、肝细胞癌、癌症中的蛋白多糖、脂质与动脉粥样硬化、人类 T 细胞白血病病毒 1 型感染、MAPK 信号通路等。分子对接结果显示热毒宁注射液中槲皮素、木犀草素、山柰酚 3 种核心活性黄酮类化合物与关键靶点 MAPK1、PRKACA、HSP90AA1 具有很好的亲和力, 并且 3 种活性化合物与 SARS-CoV-2 3CL 水解酶及 ACE2 结合能较推荐化学药小。 **结论** 热毒宁注射液对 SARS、MERS 和 COVID-19 3 种疾病具有潜在共性作用, 该作用可能与活性化合物槲皮素、木犀草素、山柰酚等作用于 MAPK1、PRKACA、HSP90AA1 等靶点, 调节多种信号通路发挥抑制炎症风暴、调节免疫功能、抗病毒等作用有关。

关键词: 热毒宁注射液; 槲皮素; 山柰酚; 木犀草素; 严重急性呼吸综合征; 中东呼吸综合征; 新型冠状病毒肺炎; 网络药理学

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2022) 05-0842-11

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2022.05.005

Study on potential common action and mechanism of Reduning Injection against SARS, MERS and COVID-19 based on network pharmacology and molecular docking technology

WANG Gaoju, JIAO Hongjun

The Second Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450014, China

Abstract: Objective To explore the potential common mechanism and active ingredients of Reduning Injection against SARS, MERS and COVID-19 through network pharmacology and molecular docking technology. **Methods** The TCMSP database was used to retrieve the chemical components and targets of *Artemisiae Annuae Herba*, *Lonicerae Japonicae Flos* and *Gardeniae*

收稿日期: 2021-10-12

基金项目: 河南省医学科技攻关计划项目 (LHGJ20200402)

第一作者: 王高举, 硕士, 主管药师, 主要从事临床药理学研究。E-mail: zygc10wgj@126.com

Fructus in Reduning Injection. The gene corresponding to the target was searched by UniProt database, and Cytoscape 3.8.2 was used to build a medicinal material-compound-target (gene) network. Three coronavirus-related targets were collected in the Gene Cards database with the key words of "SARS""MERS" and "COVID-19", and common target of three coronavirus infection diseases were screened out through Venny 2.1.0 database. The common targets of SARS, MERS and COVID-19 were intersected with the targets of Reduning Injection, and the common targets were selected as research targets. Protein-protein interaction (PPI) network map were constructed by Cytoscape3.8.2 software after importing the common targets into the STRING database to obtain data. R language was used to carry out GO biological function enrichment analysis and KEGG signaling pathway enrichment analysis, histograms and bubble charts were drew, and component-target-pathway network diagrams was constructed. The key compounds in the component-target-pathway network were selected for molecular docking with important target proteins, novel coronavirus (SARS-CoV-2) 3CL hydrolase, and angiotensin-converting enzyme II (ACE2). **Results** 31 active compounds and 207 corresponding targets were obtained from Reduning Injection. 2 453 SARS-related targets, 805 MERS-related targets, 2 571 COVID-19-related targets, and 786 targets for the three diseases. 11 common targets with Reduning Injection: HSPA5, CRP, MAPK1, HMOX1, TGFB1, HSP90AA1, TP53, DPP4, CXCL10, PLAT, PRKACA. GO function enrichment analysis revealed 995 biological processes (BP), 71 molecular functions (MF), and 31 cellular components (CC). KEGG pathway enrichment analysis screened 99 signal pathways ($P < 0.05$), mainly related to prostate cancer, fluid shear stress and atherosclerosis, hepatocellular carcinoma, proteoglycans in cancer, lipid and atherosclerosis, human T-cell leukemia virus 1 infection, MAPK signaling pathway, etc. The molecular docking results showed that the three core active flavonoids of quercetin, luteolin, and kaempferol in Reduning Injection had good affinity with key targets MAPK1, PRKACA, and HSP90AA1, and the combination of the three active compounds with SARS-CoV-2 3CL hydrolase and ACE2 was less than the recommended chemical drugs. **Conclusion** Reduning Injection has potential common effects on the three diseases of SARS, MERS and COVID-19. This effect may be related to those active compounds such as quercetin, luteolin, and kaempferol acting on targets such as MAPK1, PRKACA, HSP90AA1 to regulate multiple signal pathways and exert anti-virus, suppression of inflammatory storm, and regulation of immune function.

Key words: Reduning Injection; quercetin; luteolin; kaempferol; SARS; MERS; COVID-19; network pharmacology

近年来在局部地区或全世界范围内相继爆发了严重急性呼吸综合征(severe acute respiratory syndrome, SARS)、中东呼吸综合征(Middle East respiratory syndrome, MERS)和新型冠状病毒肺炎(2019 corona virus disease, COVID-19)等冠状病毒感染所致的呼吸道传染病,已严重威胁全球公共卫生安全^[1-2]。引起SARS、MERS和COVID-19的严重急性呼吸综合征病毒(SARS-CoV)、中东呼吸综合征冠状病毒(MERS-CoV)和新型冠状病毒(SARS-CoV-2)在基因序列上存在一定同源性,并且这3种冠状病毒引起的感染在生物学特征、流行病学等方面具有较高的相似程度,临床表现均以发热及呼吸系统症状为主^[2-5]。我国的传统中医认为SARS、MERS及COVID-19均为中医疫病范畴,病因为受疫戾之气,病位在肺,为“肺疫”,中医药在我国抗击SARS和COVID-19疫情时均发挥了重要的作用^[6],针对目前还在流行的COVID-19,中医药治疗能够有效缓解症状,能够减少轻型、普通型向重型发展,能够提高治愈率、降低死亡率,能够促进恢复期人群机体康复。我国卫生健康委员会发布的《新型冠状病毒肺炎诊疗方案》多个版本中均推荐重型和危重型患者使用中药注射剂。在《新型冠

状病毒肺炎诊疗方案(试行第八版)》中已将热毒宁注射液作为危重型内闭外脱证和重型气营两燔证的推荐中成药^[7]。热毒宁注射液主要由金银花、栀子、青蒿3味中药组成,具有清热、疏风和解毒的功效,主要应用于上呼吸道感染所致的高热、恶寒、头身痛、咳嗽、痰黄等症^[8]。目前热毒宁注射液在COVID-19重型患者早期的救治中疗效确切^[7-8],但尚缺乏从分子水平干预冠状病毒感染共性作用的具体机制研究。基于SARS、MERS与COVID-19在流行病学、生物学特征及临床症状具有相似性的特点,本研究采用网络药理学及分子对接的方法,分析热毒宁注射液治疗SARS、MERS和COVID-19冠状病毒感染疾病的共性作用及具体机制,以为热毒宁注射液的临床应用和深入开发提供参考。

1 方法

1.1 热毒宁注射液活性成分的搜集和靶蛋白的筛选

使用中药系统药理学数据库和分析平台(TCMSP, <http://lsp.nwu.edu.cn/tcmsp.php>)搜集热毒宁注射液的活性成分:在“信息设定”模块,分别以“青蒿”“金银花”“栀子”为关键词检索热毒宁注射液中所含的化学成分;以类药性(DL)≥0.18、药

物半衰期(HL)≥4、相对分子质量(MW)≤500作为条件,筛选出较高活性的化合物并获取化合物对应的靶点蛋白;使用蛋白质数据库(UniProt, <http://www.uniprot.org/uniprot/>)中的UniProtKB搜索功能查找所有靶基因名称和Unitprot编号,将筛选得到的靶蛋白名称转换为统一的基因名称^[9]。

1.2 热毒宁注射液活性成分-靶点网络的构建

将热毒宁注射液主要活性成分及其靶点导入到Cytoscape Version 3.8.2来构建热毒宁注射液的成分-靶点网络图,导出网络图中的拓扑数据[度值(degree)及介值中心度(betweenness centrality)],使用Network Analyzer功能分析其拓扑学属性。设置度值(degree)大于所有节点连接度值中位数的2倍来作为标准进行筛选,确定关键节点后探讨热毒宁注射液潜在物质基础。

1.3 SARS、MERS和COVID-19共性靶点的搜集与筛选

使用GeneCards数据库(<https://www.genecards.org/>)搜集SARS、MERS和COVID-19疾病的相关靶点。以“SARS”“MERS”和“COVID-19”为关键词,搜集3种冠状病毒感染疾病相关的靶点信息,剔除重复靶点,并经Uniprot校正整合,即为3种冠状病毒感染疾病相关靶点,通过Venny 2.1.0数据库映射筛选出SARS、MERS和COVID-19疾病的共有靶点。

1.4 热毒宁注射液化学成分-疾病-靶点网络构建

通过Venny 2.1.0数据库将热毒宁注射液活性成分靶点与3种冠状病毒感染疾病的共有靶点进行映射,得到其治疗3种冠状病毒感染疾病的潜在共性靶点,将共性靶点作为热毒宁注射液的活性靶点导入到Cytoscape 3.8.2中,构建有效成分-疾病-靶点的可视化网络并分析其拓扑学属性。

1.5 蛋白质相互作用网络(PPI)的构建

将热毒宁注射液与3种冠状病毒感染疾病的共性靶点导入到String数据库(<https://string-db.org/>),评分条件(置信度)设定>0.4,蛋白种类设置为“Homo sapiens”,使用“Cytohubba”插件分析度值,确定热毒宁注射液抗3种冠状病毒感染疾病的核心靶点,将分析结果保存为RTF格式并保留文件中的结合率评分和节点等信息,使用Cytoscape 3.8.2软件构建靶点PPI网络。

1.6 基因本体论(GO)生物学功能富集分析及京都基因和基因组百科全书(KEGG)信号通路富集分析

利用R语言^[10](clusterProfiler、org.Hs.eg.db、

enrichplot、ggplot2、pathview)进行GO分析及KEGG分析,对潜在作用靶点从生物过程(BP)、细胞功能(MF)和细胞组分(CC)3个方面分别进行富集分析,并进行KEGG通路富集分析,按阈值 $P<0.05$ 为标准进行筛选,以涉及靶点数目的多少进行排序,以条形图和气泡图形式输出结果并展示GO富集分析筛选出的前10个条目和KEGG富集的前20个信号通路,使用Cytoscape 3.8.2软件,构建成分-靶点-通路网络图。

1.7 分子对接

筛选成分-靶点-通路网络中度值排名前3的靶点蛋白及其对应的化合物,分别与COVID-19关键靶点[SARS-CoV-2 3CL水解酶、血管紧张素转化酶II(ACE2)]进行分子对接。在PubChem数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)中下载上述化合物的2D结构(.sdf格式);利用Chem-office软件绘制化合物的3D结构,使其能量最小化后保存为.mol2格式。在PDB数据库(<https://www.rcsb.org/>)中下载排名前3的靶蛋白及SARS-CoV-2 3CL水解酶、ACE2的3D结构(.pdb格式);利用Pymol软件对上述受体蛋白进行去水、去有机小分子配体等操作。利用AutoDock-Tools软件对上述配体和受体进行加氢、加电子并分别保存为.pdbqt格式。运行Vina对接,受体为刚性大分子,配体为柔性小分子,计算每个活性化合物的最优结合能。

2 结果

2.1 热毒宁注射液主要活性化合物及作用靶点

通过TCMSP数据库,根据其MW、DL和HL值从3种中药中共筛选出41个候选化合物,去除重复化合物剩余31个候选化合物(表1),其中金银花化合物14个,栀子化合物10个,青蒿化合物17个。金银花和栀子共有6个化合物,金银花和青蒿共有4个化合物,栀子和青蒿共有3个化合物,青蒿、金银花和栀子共有3个化合物。31个候选化合物中,有28个候选化合物可在TCMSP数据库中匹配到207个人类靶点,3个候选化合物未能匹配到相关靶点。

2.2 热毒宁注射液成分-靶点网络

如图1所示,热毒宁注射液成分-靶点网络图中共有药物成分28个(圆形排列),靶点207个(矩形排列)。网络中579条边代表了成分与靶点之间的作用关系。每个成分平均作用于7.393(207/28)个靶点,而每个靶蛋白平均连接药物成分的数量为2.797(579/207),表明热毒宁注射液多成分及多靶点的整体协同作用。使用Cytoscape 3.8.2中的Network

表1 热毒宁注射液中活性成分

Table 1 Effective chemical constituents of Reduning Injection

MOL ID	化合物名称	MW	DL	HL	来源中药
MOL001495	ethyl linolenate	306.54	0.197 16	6.200 513	金银花
MOL002914	eriodyctiol (flavanone)	288.27	0.243 60	15.876 340	金银花
MOL003006	(-)-(3R,8S,9R,9aS,10aS)-9-ethenyl-8-(beta-D-glucopyranosyloxy)-2,3,9,9a,10,10a-hexahydro-5-oxo-5H,8H-pyrano[4,3-d]oxazolo[3,2-a]pyridine-3-carboxylic acid_qt	281.29	0.232 88	5.496 385	金银花
MOL003036	zinc03978781	412.77	0.756 47	5.789 431	金银花
MOL003044	chryseriol	300.28	0.274 15	16.312 018	金银花
MOL003111	centauroside_qt	434.48	0.504 82	5.182 441	金银花
MOL003124	xylostosidine	415.51	0.636 90	9.149 100	金银花
MOL000354	isorhamnetin	316.28	0.306 00	14.339 263	青蒿
MOL000359	sitosterol	414.79	0.751 20	5.371 091	青蒿
MOL002235	eupatin	360.34	0.408 04	13.939 923	青蒿
MOL004083	tamarixetin	316.28	0.306 25	14.591 663	青蒿
MOL004112	patuletin	332.28	0.339 94	14.310 080	青蒿
MOL004609	areapillin	360.34	0.413 94	16.522 177	青蒿
MOL005229	artemetin	388.40	0.478 70	15.009 236	青蒿
MOL007274	skrofulein	314.31	0.296 77	15.804 495	青蒿
MOL007401	cirsiliol	330.31	0.337 28	15.044 885	青蒿
MOL007412	DMQT	346.31	0.368 22	15.157 598	青蒿
MOL007415	[(2S)-2-[[[(2S)-2-(benzoylamino)-3-phenylpropanoyl]amino]-3-phenylpropyl] acetate	444.57	0.519 57	6.031 565	青蒿
MOL007426	deoxyartemisinin	266.37	0.261 03	4.658 828	青蒿
MOL007400	vicenin-2_qt	270.25	0.213 06	16.751 617	青蒿
MOL002883	ethyl oleate (NF)	310.58	0.190 61	4.850 269	栀子
MOL004561	sudan III	352.42	0.590 97	8.988 662	栀子
MOL007245	3-methylkempferol	300.28	0.264 54	16.364 531	栀子
MOL001663	(4aS,6aR,6aS,6bR,8aR,10R,12aR,14bS)-10-hydroxy-2,2,6a,6b,9,9,12a-heptamethyl-1,3,4,5,6,6a,7,8,8a,10,11,12,13,14b-tetradecahydronicene-4a-carboxylic acid	456.78	0.757 13	4.337 611	栀子
MOL000006	luteolin	286.25	0.245 52	15.944 492	金银花、青蒿
MOL000358	beta-sitosterol	414.79	0.751 23	5.355 491	金银花、栀子
MOL001494	mandenol	308.56	0.193 21	5.385 969	金银花、栀子
MOL003095	5-hydroxy-7-methoxy-2-(3,4,5-trimethoxyphenyl)chromone	358.37	0.406 56	15.979 714	金银花、栀子
MOL000098	quercetin	302.25	0.275 25	14.400 548	金银花、青蒿、栀子
MOL000422	kaempferol	286.25	0.240 66	14.743 371	金银花、青蒿、栀子
MOL000449	stigmasterol	412.77	0.756 65	5.574 595	金银花、青蒿、栀子

Analyzer 插件进行靶点行网络拓扑学分析,依据节点的度值及介值中心度描述网络节点,节点度值的中位数为3,平均度值为4.928,其中度值排在前10位的药物成分和靶点见表2、3。

2.3 SARS、MERS和COVID-19的共性靶点

COVID-19相关靶点共有2 571个,SARS相关靶点共有2 453个,MERS相关靶点有805个。靶点映射结果显示,COVID-19和SARS、MERS这3种冠状病毒感染疾病有共性靶点786个(图

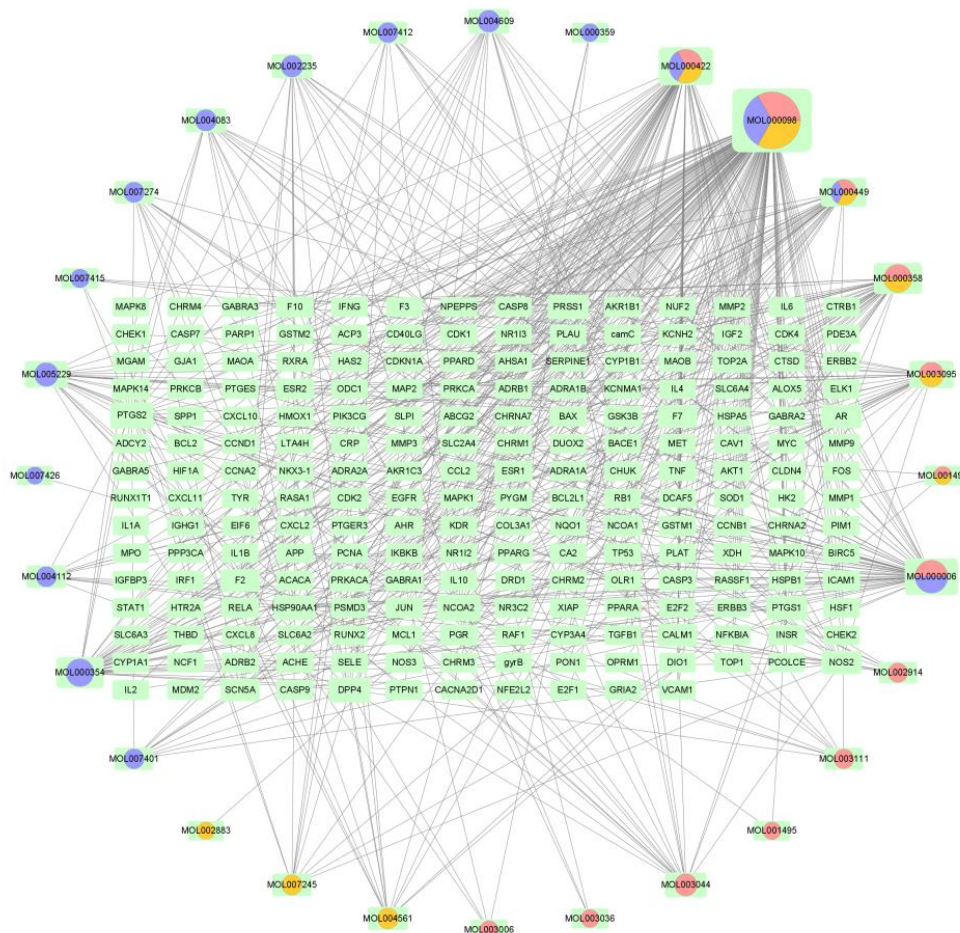


图1 热毒宁注射液的主要成分-靶点网络

Fig. 1 Main components-target network of Reduning Injection

表2 热毒宁注射液的主要活性成分(度值排名前10位)

Table 2 Main active ingredients of Reduning Injection (top 10 in degree)

MOL ID	化学名称	度值	介值中心度
MOL000098	quercetin	140	0.592
MOL000422	kaempferol	59	0.420
MOL000006	luteolin	55	0.413
MOL000358	beta-sitosterol	38	0.391
MOL000354	isorhamnetin	37	0.389
MOL000449	stigmasterol	30	0.380
MOL0003095	5-hydroxy-7-methoxy-2-(3,4,5-trimethoxyphenyl)chromone	26	0.374
MOL005229	artemetin	23	0.371
MOL003044	chryseriol	18	0.365
MOL004609	areapillin	17	0.364

2),提示这3种冠状病毒感染疾病存在共性发病机制。

2.4 热毒宁注射液与3种冠状病毒感染疾病的共性靶点及PPI网络

将热毒宁注射液的207个药物靶点与786个3种冠状病毒感染疾病的共性靶点通过Venny 2.1.0

映射后得到11个共同靶点,为进一步探讨热毒宁注射液成分靶点和3种冠状病毒感染疾病共性靶点在蛋白水平上的具体机制,运用STRING平台对11个共同靶蛋白进行PPI网络分析,运用Cytoscape 3.8.2绘制具体的PPI网络,结果见图3,其中靶点度值从大到小依次为:HSPA5、CRP、MAPK1、HMOX1、

表3 热毒宁注射液的主要靶点(度值排名前10位)
Table 3 Main targets of Reduning Injection (top 10 in degree)

靶点	度值	介值中心度
NCOA2	23	0.518
PTGS2	22	0.518
DPP4	18	0.468
HSP90AA1	17	0.490
PRSS1	16	0.462
PTGS1	15	0.496
AR	14	0.459
NOS2	13	0.329
PRKACA	11	0.483
F2	11	0.433

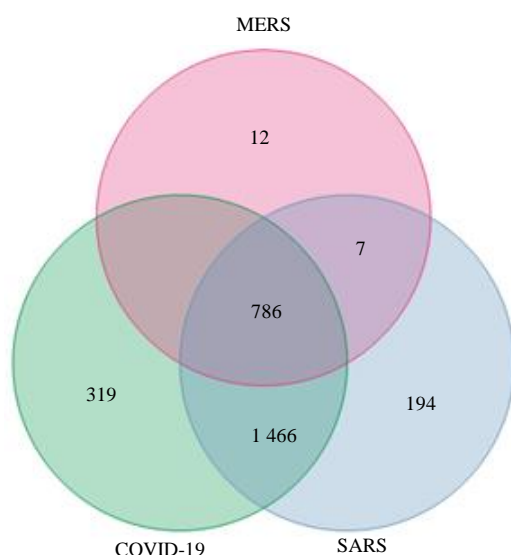


图2 COVID-19和SARS、MERS共性靶点

Fig. 2 Common targets of COVID-19, SARS and MERS

TGFB1、HSP90AA1、TP53、DPP4、CXCL10、PLAT、PRKACA。

2.5 GO富集分析和KEGG信号通路富集分析

对筛选出的11个作用靶点利用R语言包进行GO富集分析和KEGG信号通路富集分析($P < 0.05$)。GO富集分析中共得到BP 995个, MF 71种, CC 31种。根据校正后 P 值进行排序,选择排名前10位的进行图形展示,结果见图4。KEGG通路富集筛选得到99条信号通路($P < 0.05$),主要涉及前列腺癌(prostate cancer)、流体剪切应力和动脉粥样硬化(fluid shear stress and atherosclerosis)、肝细胞癌(hepatocellular carcinoma)、癌症中的蛋白多糖(proteoglycans in cancer)、脂质与动脉粥样硬化(lipid and atherosclerosis)、人类T细胞白血病病

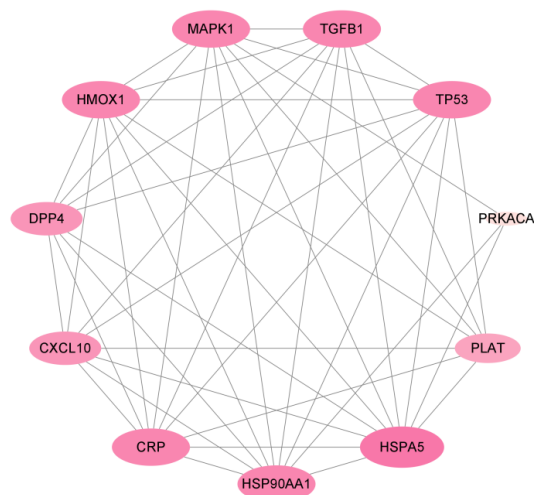


图3 热毒宁注射液与SARS、MERS和COVID-19的共性靶点PPI网络

Fig. 3 Common target PPI network of Reduning Injection and SARS, MERS, and COVID-19

毒1型感染(human T-cell leukemia virus 1 infection)、MAPK信号通路(MAPK signaling pathway)等,具体结果见图5。

2.6 热毒宁注射液成分-靶点-通路网络

将热毒宁注射液治SARS、MERS和COVID-19的11个关键靶点蛋白及其对应的21个潜在成分与KEGG信号通路富集分析的前30条通路制作成分-靶点-通路的网络关系表,导入Cytoscape 3.8.2绘制具体的成分-靶点-通路网络图,见图6。图中体现了热毒宁注射液多成分-多靶点-多通路对3种冠状病毒感染所致疾病起到综合治疗作用的特点。

2.7 热毒宁注射液中核心活性化合物与关键靶蛋白及3CL、ACE2对接结果分析

选取成分-靶点-通路网络中度值排名前3的靶点蛋白与对应的成分以及COVID-19关键靶点SARS-CoV-2 3CL水解酶、ACE2进行分子对接,结合能结果见表4,对接模型图见图7。从化合物结构分析热毒宁注射液中3种核心活性化合物(槲皮素、木犀草素、山柰酚)均为黄酮类化合物,此类药物分子与疾病靶点结合能的绝对值越高,结合形成的构象越稳定。以结合能 $\leq -5.0 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ 作为筛选标准,可见3种活性化合物与关键靶蛋白MAPK1、PRKACA、HSP90AA1的结合能及SARS-CoV-2 3CL水解酶、ACE2的结合能均小于 $-5.0 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$,并且3种活性化合物与SARS-CoV-2 3CL水解酶、ACE2结合能均低于目前临床上应用的利巴韦林、阿比多尔等阳性化学药,说明3种活性化合物与疾病关键靶点蛋白(MAPK1、PRKACA、HSP90AA1)

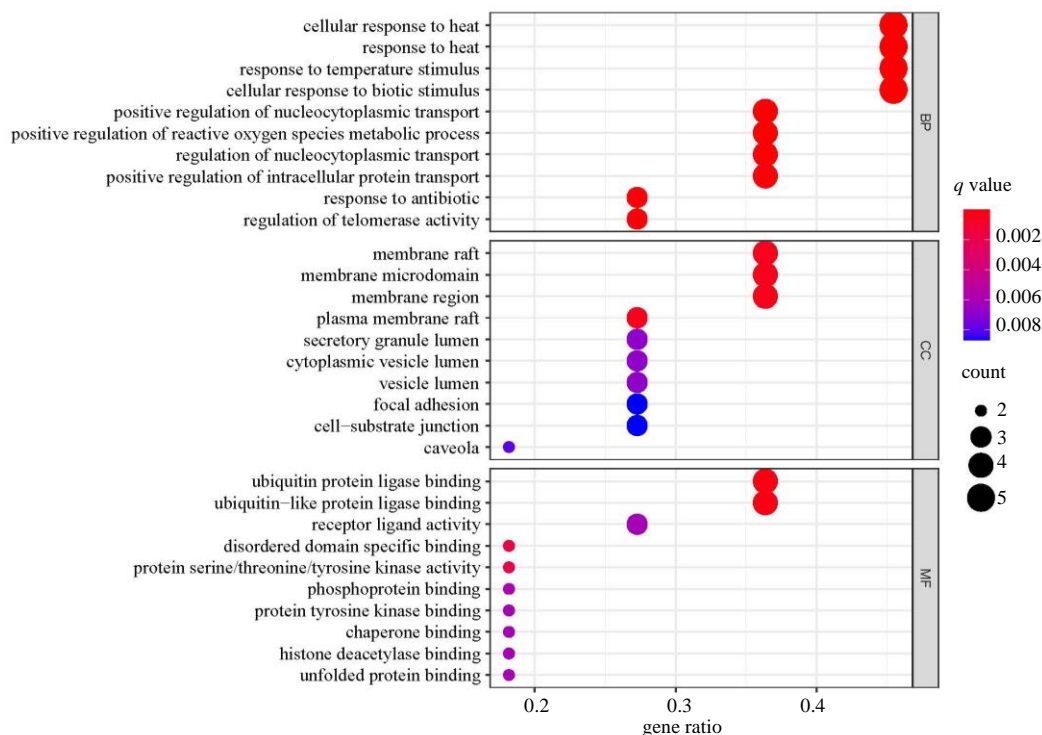


图 4 热毒宁注射液治疗 SARS、MERS 和 COVID-19 潜在靶点的 GO 功能富集分析

Fig. 4 GO function enrichment analysis of Reduning Injection in treatment of SARS, MERS, and COVID-19

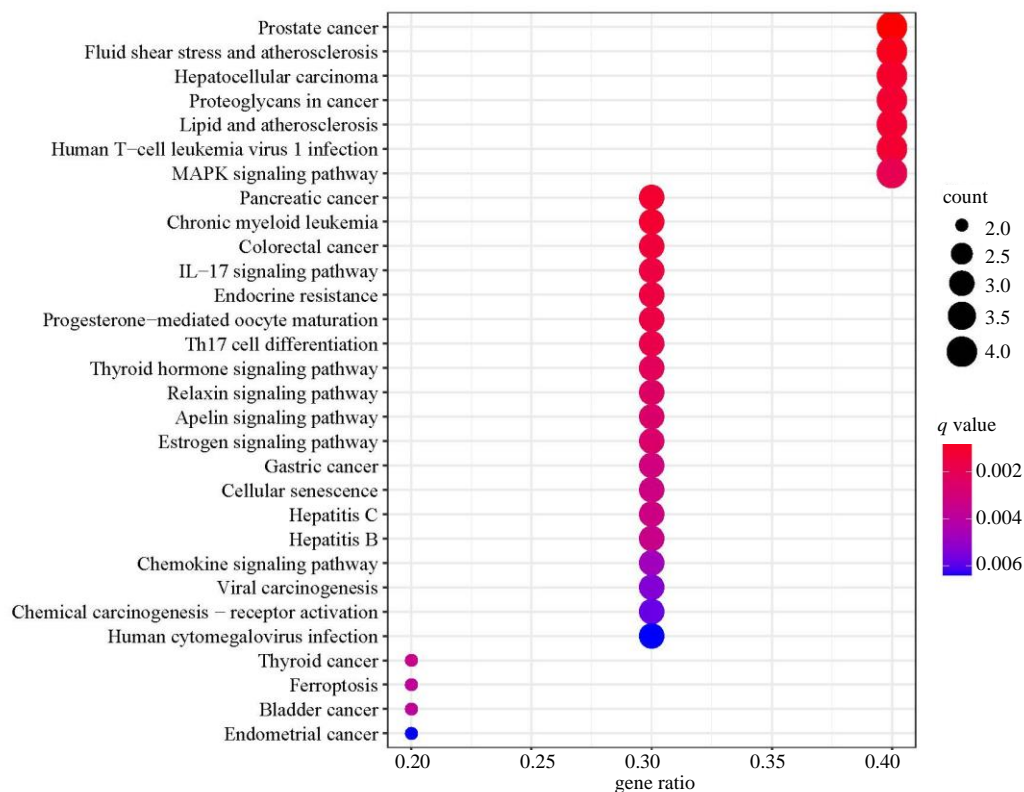


图 5 热毒宁注射液治疗 SARS、MERS 和 COVID-19 潜在靶点的 KEGG 信号通路富集分析

Fig. 5 Enrichment analysis of KEGG signaling pathway of potential targets of Reduning Injection for treatment of SARS, MERS, and COVID-19

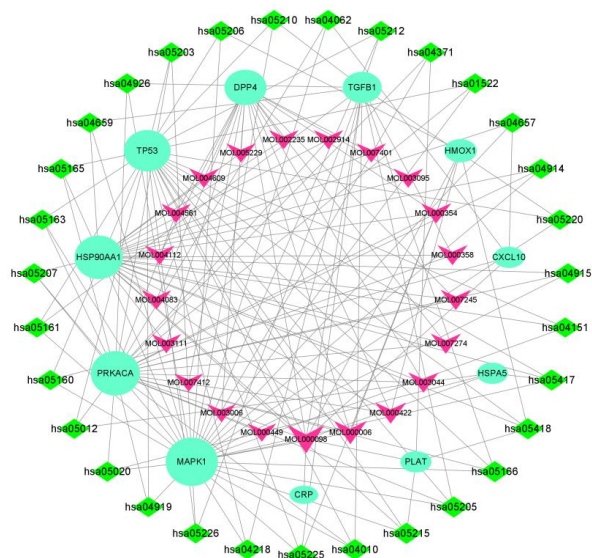


图6 热毒宁注射液成分-靶点-通路网络

Fig. 6 Component-target-pathway network of Reduning Injection

具有较好的结合活性,而且结合体构象稳定,同时3种黄酮类化合物还可直接作用于SARS-CoV-2 3CL水解酶,阻止病毒繁殖,还可与ACE2结合,改善人体免疫机能,抵抗病毒侵袭,这些可能是热毒宁注射液抗SARS、MERS和COVID-19潜在共性作用的关键成分和靶点。

3 讨论

SARS、MERS和COVID-19在生物学特征、流行病学等方面具有较高的相似程度,病理生理机制都涉及炎症、发热、缺氧休克以及体内水、电解质、酸碱平衡的紊乱,3种疾病引起的急性呼吸窘迫综合征、脓毒症休克及多器官衰竭死亡均与机体免疫细胞过度活化、细胞因子风暴和过度氧化应激有关^[11-13]。本研究中,3种冠状病毒感染疾病存在786个共性疾病靶点,表明这3种冠状病毒感染存在共性的病理机制。3种冠状病毒引起的感染中医角度均属于“疫病”范畴,在早期时均应解表清热,透邪外出,防止邪气传变入里,若邪热入里,急当凉血解

表4 热毒宁注射液中核心活性化合物与关键靶蛋白及3CL、ACE2的结合能

Table 4 Binding energy of core active compounds in Reduning Injection with key target proteins, SARS-CoV-2 3CL and ACE2

化合物	结合能/(kJ·mol ⁻¹)				
	SARS-CoV-2 3CL(PDB:6Lu7)	ACE2 (PDB:IR42)	MAPK1 (PDB:6SLG)	PRKACA (PDB:30vv)	HSP90AA1 (PDB:6GR5)
槲皮素	-7.2	-8.1	-8.1	-10.3	-8.8
木犀草素	-7.2	-8.0	-8.3	-10.9	-8.6
山柰酚	-6.9	-7.5	-8.1	-10.4	-8.2
利巴韦林	-6.0	-6.5	-6.1	-7.9	-7.1
阿比多尔	-5.9	-7.0	-7.4	-5.9	-7.9

毒^[14-15]。热毒宁注射液中金银花可清热解毒、透营转气,栀子可气血两清、表里双解,青蒿可清热护阴、除虚热骨蒸,三药合用共奏清热解毒之功^[16]。临床研究显示,热毒宁注射液可有效降低感染性休克患者体内C反应蛋白(CRP)、血清降钙素原(PCT)及炎症因子水平,促进患者肺功能和临床症状改善^[17];热毒宁注射液对甲型流感病毒A/PR/8/H1N1感染所致小鼠病毒性肺炎作用的实验研究证实热毒宁注射液可不同程度上降低小鼠肺指数、减轻肺组织病理损伤、降低病毒载量及减少白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子-α(TNF-α)的含量^[18]。

本研究结果表明,热毒宁注射液中金银花、栀子、青蒿的活性成分经筛选后分别为14、10、17个,共计31个,预测活性成分靶点207个,其中与SARS、MERS和COVID-19疾病共性靶点产生交集

的靶点有11个,这些靶点可能是热毒宁注射液治疗3种冠状病毒感染性疾病的关键靶点。成分-靶点-通路网络中排名前3的靶蛋白对应的活性成分显示热毒宁注射液中主要活性成分为槲皮素、木犀草素、山柰酚,均为黄酮类化合物。研究显示,槲皮素可通过与病毒表面蛋白结合,阻碍病毒受体复合物进入机体细胞内;还可抑制TLR-3的表达影响炎症转录因子而发挥抗病毒作用^[19]。木犀草素含有5-OH等活性基团,对病毒中的整合酶及蛋白酶均有较强的抑制作用^[20]。山柰酚可能通过抑制病毒复制,在体外有较好的抗病毒的作用^[21]。将SARS-CoV-2 3CL水解酶、ACE2及关键靶点MAPK1、PRKACA、HSP90AA1与靶点对应的成分进行分子对接,显示其结合能力优于临床推荐用化学药阿比多尔、利巴韦林,进一步证实了网络药理

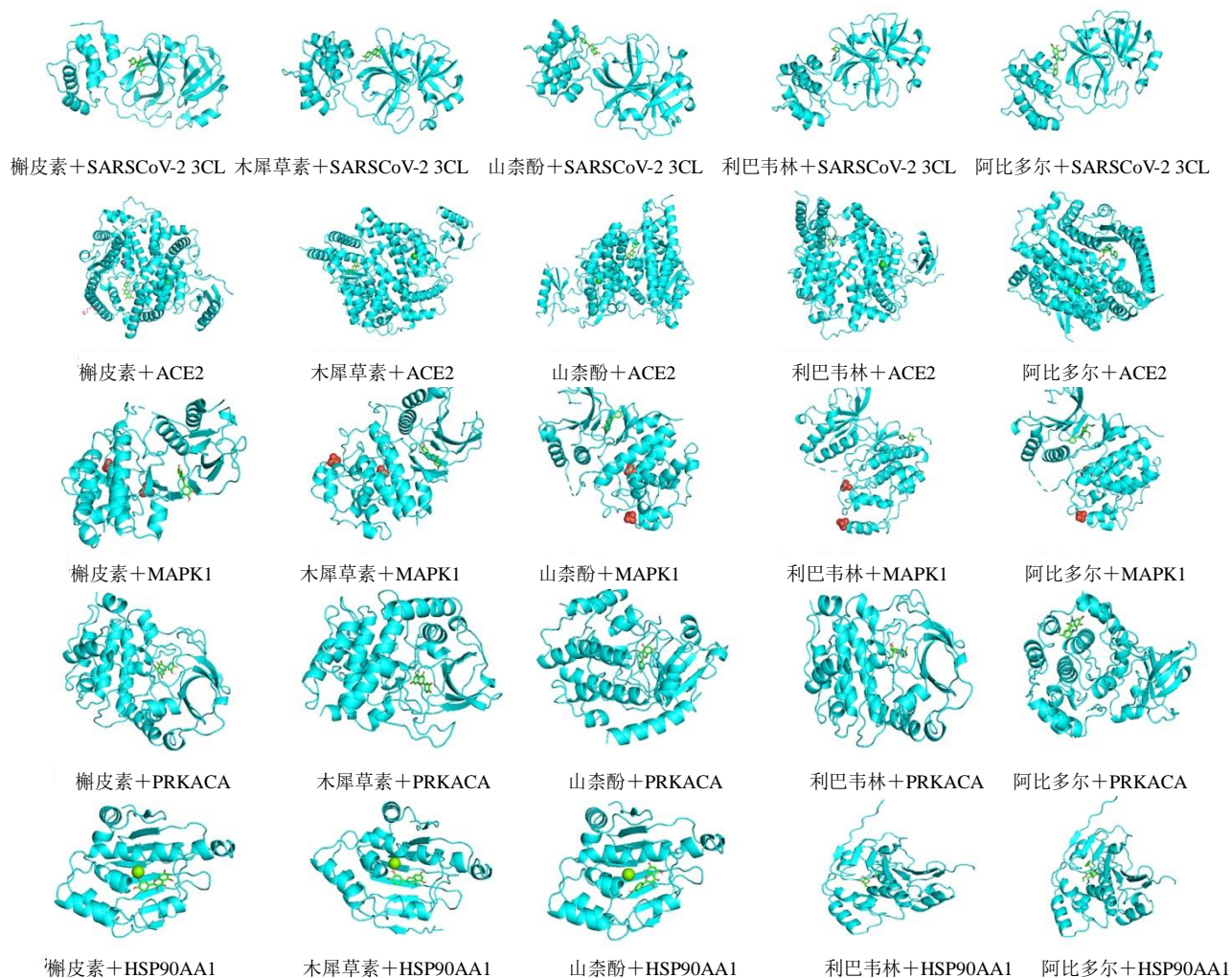


图 7 热毒宁注射液关键成分与关键靶点对接模型图

Fig. 7 Docking model of key components and key targets of Reduning Injection

学的成分筛选结果,表明热毒宁注射液中槲皮素、木犀草素、山柰酚为抗 COVID-19 和 SARS、MERS 的共性活性成分。

PPI 网络结果显示,热毒宁注射液抗 COVID-19 和 SARS、MERS 的靶点涉及 HSPA5、CRP、MAPK1、HMOX1、TGFB1 等,上述靶点存在于 MAPK、PI3K-Akt、IL-17 等信号通路和 Th17 细胞分化、癌症等多个信号通路中。与 MAPK1 密切相关的 MAPK 信号通路在 DNA 损伤、氧化应激及病毒感染中具有关键性作用,在炎症风暴中,TNF- α 可诱导 MAPK1 磷酸化产生炎症趋化因子 IL-8,介导中性粒细胞的趋化从而加重机体的炎症反应^[22]。与 CRP、CXCL10、DPP4 等有关的 PI3K-Akt、IL-17 等信号通路均参与了炎症应答、调控凋亡过程和氧化还原过程等生物过程^[23-24]。HSPA5、HSP90AA1、TP53、PRKACA 在影响 RNA 病毒的复制以及在治疗肺炎的过程中有重要作用^[25]。进一步的 GO 和 KEGG 通路富集分析

结果显示热毒宁注射液发挥作用主要集中在癌症信号转导、病毒感染、炎症、氧化应激等方面,故推断热毒宁注射液主要通过调节炎症相关通路,从而发挥抗 SARS、MERS 和 COVID-19 的疗效。研究显示,热毒宁注射液能有效抑制急性肺损伤小鼠模型的 MAPK 及 IL-17 等信号通路,减少炎症细胞因子分泌从而减轻氧化应激损伤^[26]。在热毒宁注射液的活性成分中,木犀草素可通过抑制 MAPK1 磷酸化干预 MAPK 通路,减轻中性粒细胞的炎症反应^[27-28];槲皮素可通过调节线粒体功能、降低过氧化作用来改善细胞活性^[29];山柰酚则能够调节过氧化氢酶和超氧化物歧化酶活性,抑制脂质过氧化作用,抑制炎症反应^[30]。

基于网络药理学分析认为热毒宁注射液中的槲皮素、木犀草素、山柰酚能够通过 MAPK、PI3K-Akt、IL-17 等信号通路和癌症转导等多个信号通路作用于 HSPA5、CRP、MAPK1、HMOX1、TGFB1 等

靶点,发挥抗病毒、抑制炎症风暴、调节免疫功能等作用。因此,热毒宁注射液可通过多成分-多靶点-多通路发挥抗 COVID-19 和 SARS、MERS 的作用,但鉴于网络药理学的局限性,后期仍需进一步对筛选得到的热毒宁注射液中的潜在活性成分、作用靶点及通路进行相关实验验证。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Behera B C, Mishra R R, Thatoi H. Recent biotechnological tools for diagnosis of Corona virus disease: A review [J]. *Biotechnol Prog*, 2021, 37(1): e3078.
- [2] 骆亚莉,王碧雯,安方玉,等. SARS MERS 及 COVID-19 的临床特点和器官损伤研究进展 [J]. *中国临床新医学*, 2021, 14(1): 110-115.
Luo Y L, Wang B W, An F Y, et al. Research progress in the clinical characteristics and organ damage of SARS, MERS and COVID-19 [J]. *Chin J New Clin Med*, 2021, 14(1): 110-115.
- [3] Tong L, Xing Y, Meng-xiang C, et al. Genomic characteristics of SARS-CoV, MERS-CoV and 2019-nCoV [J]. *Chin J Biomed Engin*, 2021, 30(1): 30-39.
- [4] Singh A, Singh R S, Sarma P, et al. A comprehensive review of animal models for coronaviruses: SARS-CoV-2, SARS-CoV, and MERS-CoV [J]. *Virolog Sin*, 2020, 35(3): 290-304.
- [5] 何叶艳,郑婵颖. 三种人类高致病性冠状病毒的增殖和传播机制研究进展 [J]. *浙江大学学报: 医学版*, 2020, 49(3): 324-339.
He Y Y, Zheng C Y. Replication and transmission mechanisms of highly pathogenic human coronavirus [J]. *J Zhejiang Univ Med Sci*, 2020, 49(3): 324-339.
- [6] 尤焱南,严花,汪受传,等. 新型冠状病毒肺炎 (COVID-19) 中医药治疗策略 [J]. *药物评价研究*, 2020, 43(4): 613-619.
You Y N, Yan H, Wang S C, et al. Therapeutic strategy of traditional Chinese medicine for COVID-19 [J]. *Drug Eval Res*, 2020, 43(4): 613-619.
- [7] 国家卫生健康委员会. 关于印发新型冠状病毒肺炎诊疗方案(试行第八版修订版)的通知 [EB/OL]. (2021-04-15) [2021-09-21]. <http://www.nhc.gov.cn/zyygj/s7653p/202104/7de0b3837c8b4606a0594aeb0105232b.shtml>.
National Health Commission of the people's republic of China. Notice on the issuance of new coronavirus pneumonia diagnosis and treatment plan (trial version 8 edition) [EB/OL]. (2021-04-15) [2021-09-21]. <http://www.nhc.gov.cn/zyygj/s7653p/202104/7de0b3837c8b4606a0594aeb0105232b.shtml>.
- [8] 葛雯,李海波,王振中,等. 热毒宁注射液解热抗炎活性成分研究(V) [J]. *中草药*, 2019, 50(17): 4189-4199.
Ge W, Li H B, Wang Z Z, et al. Research on antipyretic and anti-inflammatory constituents from reduning injection (V) [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2019, 50(17): 4189-4199.
- [9] 王梁凤,李慧婷,王堯,等. 基于网络药理学和分子对接技术探讨生脉注射液抗新型冠状病毒肺炎的作用机制 [J]. *中草药*, 2020, 51(11): 2977-2987.
Wang L F, Li H T, Wang Y, et al. Study on mechanism of Shengmai Injection against novel coronavirus pneumonia based on network pharmacology and molecular docking technology [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2020, 51(11): 2977-2987.
- [10] Yu G C, Wang L G, Han Y Y, et al. clusterProfiler: An R package for comparing biological themes among gene clusters [J]. *OMICS*, 2012, 16(5): 284-287.
- [11] 于海江,于洋洋,于栋,等. SARS-CoV-2、SARS-CoV-1 及 MERS-CoV 的特征比较分析 [J]. *基因组学与应用生物学*, 2020, 39(09): 4400-4404.
Yu H J, Yu Y Y, Yu D, et al. Comparison and analysis of the characteristics of SARS-CoV-2, SARS-CoV-1 and MERS-CoV [J]. *China Civ Eng J*, 2020, 39(9): 4400-4404.
- [12] 胡晶晶,童瑾. 通过与 SARS 和 MERS 的比较探索 COVID-19 远期并发症及防治措施 [J]. *基础医学与临床*, 2020, 40(7): 887-892.
Hu J J, Tong J. Exploring the long-term complications of COVID-19 and its prevention through comparison with SARS and MERS [J]. *Basic Clin Med*, 2020, 40(7): 887-892.
- [13] 祝丙华,冯攀,李芳芳,等. 三种新发现的冠状病毒病原学及临床流行病学研究进展 [J]. *中华医院感染学杂志*, 2020, 30(15): 2274-2280.
Zhu B H, Feng P, Li F F, et al. Progress of study on etiological and clinical characteristics of three types of novel coronaviruses [J]. *Chin J Nosocomiology*, 2020, 30(15): 2274-2280.
- [14] 段海婧,龙晓宙,杜丽东,等. 清肺排毒汤对三种冠状病毒感染的 SARS、MERS 和 COVID-19 的潜在共性作用及机制探讨 [J]. *中药药理与临床*, 2020, 36(4): 29-35.
Duan H J, Long X Z, Du L D, et al. Potential common action and mechanism of qingfeipaidu decoction in the treatment of SARS, MERS and COVID-19 [J]. *Pharmacol Clin Chin Mater Med*, 2020, 36(4): 29-35.
- [15] 贾维刚,周泉宇,塔娜,等. 161 例北方新型冠状病毒肺炎中医病证特点及病因病机分析 [J]. *中国中医急症*,

- 2021, 30(8): 1333-1335, 1360.
- Jia W G, Zhou Q Y, Ta N, et al. Characteristics of TCM syndromes and analysis of etiology and pathogenesis in 161 cases of COVID-19 in Northern China [J]. *J Emerg Tradit Chin Med*, 2021, 30(8): 1333-1335, 1360.
- [16] 葛雯, 李海波, 于洋, 等. 热毒宁注射液化学成分、药理作用及临床应用研究进展 [J]. *中草药*, 2017, 48(5): 1027-1036.
- Ge W, Li H B, Yu Y, et al. Research progress on chemical constituents, pharmacological action, and clinical application of Reduning Injection [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2017, 48(5): 1027-1036.
- [17] 陈军红, 张阳阳, 韩思. 热毒宁注射液治疗儿童急性上呼吸道感染临床疗效 [J]. *新中医*, 2021, 53(8): 96-99.
- Chen J H, Zhang Y Y, Han S. Clinical Effect of Reduning Injection for children with acute upper respiratory tract infection [J]. *J New Chin Med*, 2021, 53(8): 96-99.
- [18] 孙静, 赵荣华, 时宇静, 等. 热毒宁吸入溶液对甲型流感病毒 A/PR/8/H1N1 感染所致小鼠病毒性肺炎的药理作用研究 [J]. *中国药物警戒*, 2021, 18(12): 1101-1105.
- Sun J, Zhao R H, Shi Y J, et al. Pharmacological effects of reduning inhalation solution on viral pneumonia in mice infected by influenza A/PR/8/H1N1 [J]. *Chin J Pharmacovigil*, 2021, 18(12): 1101-1105.
- [19] 冯亚莉, 李浩, 刘娟, 等. 槲皮素研究进展 [J]. *中国中药杂志*, 2021, 46(20): 5185-5193.
- Feng Y L, Li H, Liu J, et al. Research progress on therapeutic potential of quercetin [J]. *China J Chin Mater Med*, 2021, 46(20): 5185-5193.
- [20] 邓东沅, 顾立刚, 刘晓婷, 等. 木犀草素体外对 H1N1 感染 A549 诱导凋亡的干预作用及机制 [J]. *中华中医药杂志*, 2017, 32(4): 1524-1527.
- Deng D Y, Gu L G, Liu X T, et al. Luteolin's intervention effect and its mechanism of apoptosis induced by H1N1 in vitro [J]. *China J Tradit Chin Med Pharm*, 2017, 32(4): 1524-1527.
- [21] Bian Y F, Lei J Q, Zhong J, et al. Kaempferol reduces obesity, prevents intestinal inflammation, and modulates gut microbiota in high-fat diet mice [J]. *J Nutr Biochem*, 2022, 99: 108840.
- [22] Guo Y J, Pan W W, Liu S B, et al. ERK/MAPK signalling pathway and tumorigenesis [J]. *Exp Ther Med*, 2020, 19(3): 1997-2007.
- [23] Liu Y X, Liu C P, Jiang C, et al. C-reactive protein inhibits high-molecular-weight adiponectin expression in 3T3-L1 adipocytes via PI3K/Akt pathway [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 472(1): 19-25.
- [24] Zhou H F, Wu J, Wang T J, et al. CXCL10/CXCR3 axis promotes the invasion of gastric cancer via PI3K/AKT pathway-dependent MMPs production [J]. *Biomed Pharmacother*, 2016, 82: 479-488.
- [25] Yang Z G, Zhuang L P, Szatmary P, et al. Upregulation of heat shock proteins (HSPA12A, HSP90B1, HSPA4, HSPA5 and HSPA6) in tumour tissues is associated with poor outcomes from HBV-related early-stage hepatocellular carcinoma [J]. *Int J Med Sci*, 2015, 12(3): 256-263.
- [26] 常秀娟, 张帅, 江益平, 等. 从细胞因子风暴探讨热毒宁注射液抗大鼠急性肺损伤作用机制 [J]. *中草药*, 2015, 46(2): 236-239.
- Chang X J, Zhang S, Jiang Y P, et al. Mechanism of Reduning Injection on anti-acute lung injury in rats based on cytokine storm [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2015, 46(2): 236-239.
- [27] 陈进芬, 刘平, 陈静, 等. 木犀草素抑制 ERK1/2 与 p38 MAPK 的活化介导鼻咽癌 CNE1 细胞的生长、移动性和肿瘤干细胞样特性 [J]. *中医学报*, 2021, 36(6): 1285-1291.
- Chen J F, Liu P, Chen J, et al. Luteolin mediates of the growth, motion and tumor stem cell-like properties of nasopharyngeal carcinoma CNE1 cells by inhibiting the activation of ERK1/2 and p38 MAPK [J]. *Acta Chin Med*, 2021, 36(6): 1285-1291.
- [28] 余洁, 彭哲, 谢婷, 等. 木犀草素对哮喘患儿外周血单核细胞 TNF- α 和 IL-6 分泌的影响及机制研究 [J]. *中国免疫学杂志*, 2019, 35(13): 1580-1583, 1589.
- Yu J, Peng Z, Xie T, et al. Effects of Luteolin on secretion of TNF- α and IL-6 in peripheral blood mononuclear cells of asthmatic children and its mechanism of action [J]. *Chin J Immunol*, 2019, 35(13): 1580-1583, 1589.
- [29] 徐巧玲, 谢建达, 徐志峰, 等. 槲皮素通过抑制内质网应激减轻病毒性感染引起的心肌细胞损伤 [J]. *中国老年学杂志*, 2021, 41(9): 1933-1936.
- Xu Q L, Xie J D, Xu Z F, et al. Quercetin reduces the damage of cardiomyocytes caused by viral infection by inhibiting endoplasmic reticulum stress [J]. *Chin J Gerontol*, 2021, 41(9): 1933-1936.
- [30] 钟文良, 熊雨, 王贤文, 等. 山柰酚抗肿瘤效应与机制研究进展 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2021, 27(20): 219-226.
- Zhong W L, Xiong Y, Wang X W, et al. Anti-tumor effect and mechanism of kaempferol: A review [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*, 2021, 27(20): 219-226.

[责任编辑 刘东博]